



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
CAMPUS II – AREIA-PB**

LUCINALVA AZEVEDO DOS SANTOS

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex
Lindl. (ORCHIDACEAE) UMA ESPÉCIE COM INTEGRIDADE GENÉTICA
AMEAÇADA: UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO**

LUCINALVA AZEVEDO DOS SANTOS

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex
Lindl. (ORCHIDACEAE) UMA ESPÉCIE COM INTEGRIDADE GENÉTICA
AMEAÇADA: UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Biodiversidade da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Leonardo Pessoa Felix
Coorientadora: Núbia Pereira da Costa

Areia-PB
2016

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB*

S237c Santos, Lucinalva Azevedo dos.

*Cultivo in vitro e aclimatização de Epidendrum cinnabarinum Salzm. ex Lindl.
(Orchidaceae) uma espécie com integridade genética ameaçada: uma estratégia para
conservação / Lucinalva Azevedo dos Santos. – Areia - PB: CCA/UFPB, 2016.*

33 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Leonardo Pessoa Félix.

1. Orquídea – Cultivo *in vitro* 2. *Epidendrum cinnabarinum* – Aclimatização 3.
Orquídea – Conservação I. Félix, Leonardo Pessoa (Orientador) II. Título.

UFPB/BSAR

CDU: 582.594(043.3)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
CAMPUS II – AREIA-PB

TÍTULO: “CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (ORCHIDACEAE) UMA ESPÉCIE COM INTEGRIDADE GENÉTICA AMEAÇADA: UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO”

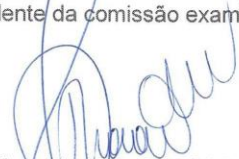
AUTOR: LUCINALVA AZEVEDO DOS SANTOS

JULGAMENTO

CONCEITO: *Aprovado*

EXAMINADORES:


Dr. Leonardo Pessoa Felix
Presidente da comissão examinadora


Dra. Dilma Maria de Brito Melo Trovão
Examinador externo


Dra. Luciana Gomes Barbosa
Examinador interno

Areia - PB, 24 de fevereiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois o dom da vida nos possibilita perceber que somos todos especiais. Sua presença em minha vida me deu força a cada momento, nos desafios e conquistas da vida.

Sou eternamente grata à minha família, aos meus pais, Maria de Lourdes e Cosme Batista (*in memoriam*). Com eles aprendi que a humildade é a fortaleza das pessoas. Ao meu esposo, Rogério do Nascimento, que como sempre me deu apoio para minhas conquistas. A todos da minha família que em sua consciência reconhecem a minha força de vontade para seguir na vida acadêmica. À minha pequenina Heloísa Azevedo, minha filha. Olhar pra ela já é o suficiente pra me dá motivos para nunca desistir na vida.

Agradeço aos meus colegas do laboratório, Otacílio e Sabrina, que contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os estagiários do laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais (LabCultive), que de forma indireta ou diretamente fazem os trabalhos acontecerem. Neste mesmo sentido agradeço aos funcionários Cosme e Adriana por estarem presentes e fazer parte da nossa família acadêmica.

Também agradeço aos meus colegas de curso Amanda dos Santos, Larisse Bianca, Thays Rodrigues e Marcelo Matos por me prestigiarem com sua amizade e podermos passar por momentos inesquecíveis ao longo desse mestrado.

Aos meus professores orientador e co-orientadora, respectivamente, Leonardo Pessoa Felix e Núbia Pereira da Costa pela enorme contribuição na minha vida acadêmica, os quais são merecedores das mais dignas considerações.

Ao professor Walter Esfrain Pereira, pela sua contribuição, atenção e colaboração.

E por último, e não menos importante, agradeço aos professores colaboradores e coordenadores que fazem o programa de Pós Graduação em Biodiversidade. Sou grata pelo apoio e profissionalismo de todos.

RESUMO

A espécie objeto desse estudo, *Epidendrum cinnabarinum* Salzm, além de possuir grande potencial ornamental, possui uma distribuição disjunta entre afloramentos rochosos da Região Nordeste, com pequenas populações caracterizadas por grandes diferenças genéticas interpopulacionais, o que torna a integridade genética da espécie ameaçada. Técnicas de cultivo *in vitro* propiciam obter uma grande quantidade de mudas em espaço e tempo reduzido, podendo ser empregada em projetos de recolonização da espécie ou para fins comerciais. Dentre os componentes dos meios de cultura, a sacarose é um componente muito importante no meio de cultura *in vitro* servindo como fonte de carbono e energia. Em nosso trabalho foi utilizado o meio 1/2MS com cinco diferentes concentrações sacarose: 0,0g.L⁻¹; 10,0g.L⁻¹; 20,0g.L⁻¹; 30,0g.L⁻¹ e 40,0g.L⁻¹ de sacarose. Aos 10 dias de inoculação foi avaliada a germinação e aos 80 dias avaliou-se a formação de primórdio foliares nos protocormos; aos 270 dias de inoculação foram avaliadas: número de folhas, números de raízes, comprimento de maior raiz, comprimento da parte aérea, diâmetro de caule, número de plântulas e número total de protocormos. Para a aclimatização plântulas oriundas do desenvolvimento *in vitro* nas referidas concentrações de sacarose foram transplantadas para vasos contendo vermiculita e esfagno na proporção de 1:1, compondo 5 tratamentos com cinco repetições e dez plântulas em cada parcela. Aos 45 dias de aclimatização as plantas foram avaliadas quanto à taxa de sobrevivência, número de folhas, números de raízes, comprimento de maior raiz, comprimento da parte aérea, diâmetro de caule e comprimento de maior folha. Não houve germinação na concentração de 0,0g.L⁻¹ de sacarose. As demais concentrações de sacarose apresentaram germinação e formação de primórdios foliares. A concentração de 40,0g.L⁻¹ de sacarose apresentou os melhores resultados para a maioria das variáveis avaliadas, além de promover melhor aclimatização nas plântulas de *E. cinnabarinum*. Conclui-se que o desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de *E. cinnabarinum* foi fortemente e positivamente influenciado pela concentração de sacarose no meio de cultura para todas as variáveis analisadas, com melhores resultados nas concentrações de 30,0g.L⁻¹ e 40,0g.L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: Orquídea; Carboidrato; Meio de Cultura.

ABSTRACT

The target species of this study, *Epidendrum cinnabarinum* Salzm, besides having high ornamental potential, has a disjunct distribution between rocky outcrops in Northeast region, with small populations characterized by large interpopulation genetic differences, which makes the specie genetic integrity being threatened. *In vitro* cultivation techniques propitiate to obtain a large quantity of seedlings in limited time and space, being able to be used in resettlement projects of the specie or for commercial purposes. Among the components of the culture media, sucrose is a very important component in the culture medium *in vitro* that serves as a source of carbon and energy. In our study we used the medium 1 / 2MS with five different concentrations of sucrose: 0,0g.L⁻¹; 10,0g.L⁻¹; 20,0g.L⁻¹; 30,0g.L⁻¹ and 40,0g.L⁻¹ sucrose. After 10 days of inoculation and germination it was evaluated, and over 80 days, it was evaluated the leaf primordium formation in protocorm; over 270 days of inoculation were evaluated: number of leaves, numbers of roots, bigger root length, shoot length, stem diameter, number of seedlings and total number of protocorms. For acclimatization seedlings originated *in vitro* development in these sucrose concentrations, they were transplanted to pots containing vermiculite and sphagnum moss in the ratio 1: 1, comprising five treatments with five replications, and ten seedlings in each individual plot. Over 45 days of acclimatization, the plants were evaluated for survival rate, number of leaves, numbers of roots, bigger root length, shoot length, stem diameter and larger sheet length. There was no germination at a concentration of 0,0g.L⁻¹ sucrose. The remaining sucrose concentrations showed germination and formation of leaf primordia. The concentration of 40,0g.L⁻¹ sucrose showed the best results for the majority of variables, in addition to promote better acclimatization in seedlings of *E. cinnabarinum*. It was concluded that the *in vitro* and *ex vitro* development of *E. cinnabarinum* was strongly and positively influenced by the concentration of sucrose in the culture medium for all variables with better results at concentrations of 30,0g.L⁻¹ and 40, 0g.L⁻¹ sucrose.

Keywords: Orchid; Carbohydrate; Culture Medium.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Formação de primórdios foliares em diferentes concentrações de sacarose aos 80 dias de inoculação das sementes de *E. cinnabarinum*. 1= 0,0g.L⁻¹ de sacarose; 2= 10,0g.L⁻¹ de sacarose; 3=20,0g.L⁻¹ de sacarose; 4= 30,0g.L⁻¹ de sacarose e 5= 40,0g.L⁻¹ de sacarose.....19
- Figura 2** - Médias de *E. cinnabarinum*, aos 270 dias após a inoculação, em diferentes concentrações de sacarose: A) Média de comprimento de parte aérea de plântula; B) Média de número de plântulas; C) Média de número de raiz; D) Média de diâmetro de caule.....21
- Figura 3** - Plântula de *E. cinnabarinum* aos 270 dias após inoculação, em diferentes concentrações de sacarose. A) 10,0g.L-1 de sacarose; B) 20,0g.L-1 de sacarose; C) 30,0g.L-1 de sacarose e D) 40,0g.L-1 de sacarose.....22
- Figura 4** - *E. cinnabarinum* aos 45 dias de aclimatadas, oriundas do cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose: A) Porcentagem de sobrevivência; B) Média de comprimento da plântula; C) Média de número de folhas; D) Média de massa fresca total; A) Média de comprimento de maior raiz de *E. cinnabarinum* e B) Média de diâmetro de maior raiz de *E. cinnabarinum* (aos 45 dias de aclimatadas, oriundas do cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose).....23
- Figura 5** - *E. cinnabarinum* aos 45 dias de aclimatadas, germinada e desenvolvida em diferentes concentrações de sacarose. A) 10,0g.L-1 de sacarose; B) 20,0g.L-1 de sacarose; C) 30,0g.L-1 de sacarose e D) 40,0g.L-1 de sacarose;24

Sumário

Introdução Geral.....	10
Referências.....	12
Resumo.....	14
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos (cultivo <i>in vitro</i>).....	17
Material e Métodos (aclimatização).....	18
Resultado e Discussão (cultivo <i>in vitro</i>).....	18
Resultado e Discussão (aclimatização).....	22
Considerações finais.....	25
Referências.....	25

INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae se destaca pela sua utilização como planta ornamental, sendo considerado um dos grupos de plantas que mais movimentam o mercado mundial da floricultura. Neste aspecto, sua importância é indiscutível, graças, sobretudo, à beleza, exotismo, fragrância e variedade de suas flores. Por outro lado, o elevado potencial ornamental das orquídeas tem contribuído para uma extração excessiva na natureza, de forma a colocar em risco de extinção muitas de suas espécies (Schneiders et al., 2012).

Epidendrum cinnabarinum é uma espécie de habitat terrestre ou saxícola caracterizada por apresentar folhas dísticas, distribuídas ao longo do caule, flores de cores vermelhas, alaranjadas, salmão e coralíneas e labelo de margem longamente fimbriada. Vegetativamente é muito similar a *Epidendrum secundum* Jacq, porém diferencia-se por apresentar flores maiores, principalmente vermelhas e com labelo fimbriado (Pabst & Dungs, 1975). A espécie ocorre principalmente na Região Nordeste do Brasil, especialmente nas regiões litorâneas dos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (Barros et al., 2016). Além dessa distribuição litorânea mais ou menos contínua, a espécie ocorre em afloramentos rochosos isolados nos Estados da Paraíba e Pernambuco.

Curiosamente, as populações dos afloramentos rochosos apresentaram uma diversidade genética interpopulacional surpreendentemente elevada em relação às populações de habitat terrestre do litoral. Nesses casos, populações de afloramentos geograficamente próximos dos municípios vizinhos de Queimadas e Fagundes, Paraíba, apresentaram plótipos completamente distintos (Pinheiro et al., 2014). Afloramentos rochosos geralmente apresentam comunidades vegetacionais bem características, com populações geralmente compostas por poucos indivíduos (Caiafa & da Silva, 2007), o que as torna extremamente ameaçadas.

Além disso, a elevada variabilidade genética interpopulacional, torna o desaparecimento de uma delas, extremamente danoso para a manutenção da diversidade genética da própria espécie. Nesse sentido, o desenvolvimento de um processo de cultivo *in vitro* para *E. cinnabarinum* proporcionará condições para a recuperação de populações ameaçadas, contribuindo dessa maneira para a manutenção do *pool* gênico da espécie. Além disso, por tratar-se de uma espécie com potencial para uso como planta ornamental, o desenvolvimento do seu *in vitro* também proporcionará condições para a produção comercial de mudas da espécie.

Uma das sinapomorfias tradicionalmente utilizadas na delimitação da família Orchidaceae, são as sementes caracteristicamente pequenas (variando de 20 até cerca de 1000µm), com embrião indiferenciado, desprovidas de endosperma funcional, com pouco

tecido nutritivo que proporcione condições para a sustentação da plântula (Arditti, 1992). Esta característica tornou a germinação das sementes de orquídeas dependentes da associação com fungos endófitos. Esta associação tem sido considerada parasítica, uma vez que após a penetração do fungo nas células do embrião, são formados "pelotas" de hifas que posteriormente são digeridas pelo hospedeiro. Curiosamente, as "pelotas" de fungo que também são observadas no córtex radicular de plantas adultas, possuem duração limitada, sugerindo sua digestão pela planta hospedeira (Arditti, 1992; Mckendrick et al., 2000, 2002; Gardes, 2002; Kerbauy e Chaer, 2011).

Estas especificidades mutualísticas para a germinação das sementes de orquídeas levou interesse científico e desenvolvimento no início do Século XX de técnicas de cultivo *in vitro* que possibilitassem um suprimento de nutrientes e minerais para a germinação e desenvolvimento das plântulas (ver, por exemplo, Knudson, 1922). Essas técnicas propiciaram a obtenção de uma grande quantidade de plantas, e constituem uma importante ferramenta para o repovoamento e reintrodução na natureza de plantas ameaçadas (revisado por Yan et al., 2010).

Um fator extremamente importante no processo de multiplicação *in vitro* de orquídeas, é a etapa *ex vitro*, ou de aclimação. Nessa situação as plantas são retiradas de um ambiente totalmente controlado em termos de luz, temperatura, nutrientes, umidade, e contaminação e passa para um sistema aberto, sem esse controle. Além disso, as plântulas provenientes de um ambiente com total suprimento de carboidratos deverão ser estimuladas ao autotrofismo. Essa passagem crítica ocorre em casa de vegetação, onde as plantas passarão por estresse hídrico, fitossanitário e nutritivo (Lone et al., 2008).

No cultivo *in vitro* é necessária a presença de carboidrato como fonte de carbono, já que nessa condição ocorre o desenvolvimento heterotrófico do vegetal. Não obstante, como particularidade de respostas fisiológicas das plantas, a concentração adequada de carboidrato varia para cada espécie, sendo geralmente utilizada no meio nutritivo, uma concentração de 20,0g.L⁻¹ a 30,0g.L⁻¹. No entanto, algumas espécies necessitam de concentrações mais elevadas de carboidrato para um melhor desenvolvimento e sucesso *in vitro*. Por exemplo: *Oncidium baueri* Lindley (SORACE et al., 2008), *Oncidium varicosum* Lindl. (Rego-Oliveira et al., 2003) e *Dendrobium nobile* Lindl. (Faria et al., 2004) necessitaram concentrações mais elevadas, entre 40,0g.L⁻¹ e 60,0g.L⁻¹. Por outro lado, *Cattleya labiata* Lindley e *Laelia itambana* Pabst (Fráguas et al., 2003) e *Cattleya walkeriana* Gardner (Dignart et al., 2009), requerem concentrações mais baixas de sacarose, correspondentes a 20,0g.L⁻¹ e 15,0g.L⁻¹, respectivamente. Portanto, para o cultivo *in vitro* de espécies nativas ainda não germinadas

experimentalmente, é importante estudar a curva de crescimento das plântulas em função do aumento da concentração de sacarose (Pivetta et al., 2010).

No presente trabalho objetivou-se avaliar diferentes concentrações de sacarose na germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum cinnabarinum*, bem como avaliar a influência dessas diferentes concentrações na aclimatização das plantas obtidas no cultivo *in vitro* visando possíveis projetos de repovoamento de populações ameaçadas ou para cultivo comercial da espécie.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: J. Wiley, 1992. 691 p.
- CAIAFA, A. N.; SILVA, A. F. Structural analysis of the vegetation on a highland granitic rock outcrop in Southeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, p. 657- 664, out. 2007.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11529>. Acesso em: 25 Jan. 2016
- DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. DE; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 33, p. 780-787, maio/jun., 2009.
- FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.780-783, out-dez 2004.
- FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V. de; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Ceres**, v.50, p.719-726, 2003.
- GARDES, MONIQUE. 2002. An orchid-fungus marriage - physical promiscuity, conflict and cheating. **New Phytologist** 154(1): 4-6.
- KERBAUY, G. B.; L. (2011). Micropropagação Comercial de Orquídeas: Conquistas, Desafios e Perspectivas. In: Gerald, L. T. S (coord) p. 178-205. **Biofábrica de plantas: Produção Industrial de Plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

- LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. DE. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 30, p. 465-469, 2008.
- MCKENDRICK, S.L.; LEAKE, J.R.; TAYLOR, D.L. & READ, D.J. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist** **154**: 233-247.
- MCKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R. & READ D. J. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. **New Phytologist** **145**: 539 -548.
- PABST, G. F. J. & DUNGS, F. 1975. Orchidaceae Brasilienses, vol. 1. **Brucke-Verlag Kurt Schmiersow**, Hildesheim.
- PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; DRAPER, D.; BARROS, F.; FELIX, L.P.; FAY, M.F.; PALMA-SILVA, C. 2014. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology** **14**: 49.
- PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. DE; TAKANE, R. J. Crescimento in vitro de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p.1897-1902, set, 2010.
- REGO-OLIVEIRA, L. DO V.; FARIA, R.T. DE; FONSECA, I. C. DE B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento in vitro de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 265-272. 2003.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, p. 185-191, mar/abr, 2012.
- SORACE, M.; FARIA, R. T. DE.; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L. DA.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento in vitro de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, p. 775-782, out./dez. 2008.
- YAM, T.W.; CHUA, J.; FELICIA TAY, F.; ANG, P. 2000. Conservation of the Native Orchids Through Seedling Culture and Reintroduction—A Singapore Experience. **The Botanical Review** **76**: 263–274.

CULTIVO IN VITRO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (ORCHIDACEAE) UMA ESPÉCIE COM INTEGRIDADE GENÉTICA AMEAÇADA: UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO

Lucinalva Azevedo dos Santos⁽¹⁾; Otacílio Damásio da Costa Júnior⁽²⁾; Sabrina Silva Pereira⁽³⁾; Núbia Pereira da Costa⁽⁴⁾; Leonardo Pessoa Felix⁽⁵⁾

⁽¹⁾Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, (CCA/UFPB). Email: lucinalvaazevedo@outlook.com

⁽²⁾Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências. Email: otaliciodamasio934@hotmail.com

⁽³⁾Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências. Email: sa_bio@outlook.com

⁽⁴⁾Professora Doutora. Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB). Email: nubia@cca.ufpb.com

⁽⁵⁾Professor Doutor. Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB). Email: lpfelix2@gmail.com

Resumo - O objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações de sacarose na germinação e desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* *E. cinnabarinum*. O meio utilizado foi reduzido a metade de sais MS, adicionado 2g.L⁻¹ de carvão ativado, 7g.L⁻¹ de ágar, em seguintes tratamentos: 0,0g.L⁻¹; 10,0g.L⁻¹; 20,0g.L⁻¹; 30,0g.L⁻¹ e 40,0g.L⁻¹ sacarose. Aos 270 dias de inoculação foram avaliados: número de folhas, números de raízes, comprimento de maior raiz, comprimento da parte aérea, diâmetro de caule, número de plântulas e número total de protocormos. Para aclimação plantas foram transplantadas para recipientes que contendo esfagno e vermiculita na proporção de 1: 1. Aos 45 dias de aclimação as plantas foram avaliadas quanto à taxa de sobrevivência, número de folhas, números de raízes, comprimento de maior raiz, comprimento da parte aérea, diâmetro de caule e comprimento de maior folha. Os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial. A concentração de sacarose 40,0g.L⁻¹ apresentou os melhores resultados para a maioria das variáveis, além de promover uma melhor aclimação em mudas de *E. cinnabarinum*. Concluiu-se que uma concentração de sacarose 40,0g.L⁻¹ pode ser utilizado para a cultura *in vitro* e *ex vitro* para as espécies, tanto para fins comerciais, como de conservação.

Termos para indexação: Ornamental; *Epidendrum cinnabarinum*; Protocormos.

IN VITRO CULTIVATION AND ACCLIMATIZATION OF *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. ex Lindl. (ORCHIDACEAE) ONE KIND WITH INTEGRITY GENETIC THREAT: A STRATEGY FOR CONSERVATION

Abstract - The aim of this study was to test different concentrations of sucrose *in vitro* germination and development and *ex vitro* *E. cinnabarinum*. The medium used was halved MS salts, added 2g.L⁻¹ of activated carbon, 7g.L⁻¹ agar, in following treatments: 0,0g.L⁻¹; 10,0g.L⁻¹; 20,0g.L⁻¹; 30,0g.L⁻¹ and 40,0g.L⁻¹ sucrose. Over 270 days of inoculation were evaluated: number of leaves, numbers of roots, bigger root length, shoots length, stem diameter, number of seedlings and total number of protocorms. For acclimatization plants were transplanted for containers containing sphagnum moss and vermiculite at a ratio of 1: 1.

Over 45 days of acclimatization the plants were evaluated for survival rate, number of leaves, numbers of roots, bigger root length, shoot length, stem diameter and larger sheet length. Data were submitted to polynomial regression analysis. The concentration of 40,0g.L⁻¹ sucrose showed the best results for most variables, in addition to promote a better acclimatization in *E. cinnabarinum* seedlings. It was concluded that a 40,0g.L⁻¹ sucrose concentration may be used for *in vitro* and *ex vitro* culture for the species, both for commercial purposes such as maintenance.

Index terms: Ornamental; *Epidendrum cinnabarinum*; Protocorms.

Introdução

Na família Orchidaceae, o gênero *Epidendrum* constitui um megagênero com mais de 1.400 espécies, sendo considerado o segundo maior gênero da família (Chase, 2015). Trata-se de um grupo filogeneticamente complexo, formando diversos clados monofiléticos. *Epidendrum cinnabarinum* é incluído no clado *Amphiglottis* que compreende plantas epífitas, saxícolas e terrestres amplamente distribuídas pelos neotrópicos (Hágsater & Soto-Arenas, 2010). A espécie ocorre principalmente na Região Nordeste do Brasil, em áreas de restinga dos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande Norte (Barros et al., 2016).

Além da distribuição primariamente litorânea mais ou menos contínua, *E. cinnabarinum* pode ser observado em afloramentos rochosos da Paraíba e Pernambuco, em Brejos de altitude ou no domínio das Caatingas. Estas populações se diferenciam das litorâneas por apresentarem uma diversidade genética interpopulacional significativamente mais elevadas do que as populações do litoral. Mesmo populações de afloramentos geograficamente próximos, como observado nos municípios Queimadas e Fagundes, Estado da Paraíba, apresentaram plótipos completamente distintos (Pinheiro et al., 2014). Esses afloramentos rochosos, também conhecidos como inselbergues (*sensu* Barthlott & Porembski, 2000) são constituídos por espécies adaptadas a ambientes submetidos a forte estresse hídrico e térmico, formando comunidades com relativa similaridade florística, com pequenas populações ecologicamente e reprodutivamente isoladas (Barthlott & Porembski, 2000; Caiafa & Da Silva, 2007; Porto et al., 2008). Esse tipo de distribuição, tipicamente está relacionado à especiação alopátrica por isolamento reprodutivo de populações submetidas a diferentes pressões de seleção (Grant, 1989), o que torna essas pequenas populações isoladas extremamente susceptíveis às coletas predatórias. Além disso, por trata-se de uma espécie com elevado potencial para cultivo como ornamental e obtenção de híbridos artificiais (Arditti, 1992), a espécie atrai a atenção para a coleta sem controle em seu habitat. Nesse sentido, técnicas de cultivo *in vitro* que propiciem a obtenção de maior quantidade dessas

plantas podem favorecer a manutenção da espécie na natureza e até mesmo atender as expectativas para o potencial interesse econômico da espécie.

Segundo Ulisses & Soares (2013) as orquídeas estão entre as plantas que mais movimentam o mercado mundial de flores, sendo comercializados aproximadamente US\$ 20 bilhões por ano, tendo sido registrado para o Brasil um volume de aproximadamente quatro bilhões de reais para o comércio varejista de orquídeas (Reis, 2011). Infelizmente, uma parte desse volume comercializado é proveniente do extrativismo predatório que, aliado à contínua urbanização e ao aumento das fronteiras agrícolas, contribuíram para que diversas espécies entrassem em iminente perigo de extinção (Galdiano-Júnior et al., 2013). Em populações geneticamente pouco estruturadas como nos inselbergues, qualquer perturbação no habitat pode afetar grandemente a regeneração de toda uma população, o que globalmente pode ser um dos fatores responsáveis pelo declínio no número de espécies da família Orchidaceae como um todo (Than et al., 2011).

O cultivo *in vitro* é considerado uma técnica capaz de produzir plantas em larga escala, além de possibilitar a obtenção de uma grande quantidade de mudas em espaço e tempo reduzidos. Mais de 500 milhões de plantas são propagadas *in vitro* anualmente, sendo a maioria constituída por espécies ornamentais (Debergh, 1994). As técnicas de cultivo *in vitro* são comprovadamente eficientes na germinação de sementes de várias espécies de orquídeas, na multiplicação dos indivíduos, além de produzir plantas com excelente qualidade fitossanitária (Suzuki et al., 2009). A semeadura *in vitro* permite obter um número de plantas muito maior, especialmente quando comparada às condições naturais. As orquídeas possuem sementes desprovidas de endosperma funcional (Freudenstein & Rasmussen, 1999), e embora haja aproximadamente 500 mil sementes, por exemplo, em uma única cápsula, sua germinação na natureza se torna difícil devido à dependência do fungo micorrizo para sua nutrição (Chang, 2007; Kerbauy & Chaer, 2011).

Na composição do meio de cultura, a sacarose é um componente muito importante, servindo como fonte de carbono e energia (Faria et al., 2004) e de acordo com as respostas fisiológicas das plantas, sua concentração pode influenciar no desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro*, sendo importante estudar a curva de resposta em função do aumento da concentração de sacarose em diferentes espécies (Pivetta et al., 2010).

A última etapa do cultivo *in vitro*, consiste na aclimatização das plântulas que saem de uma condição totalmente controlada de luminosidade, temperatura, assepsia e nutrição e passam para uma condição *ex vitro* muito menos controlada. Nessa etapa, as plântulas passam, para o autotrofismo, além de se adaptarem as novas condições sem controle de luz e

temperatura. Plântulas aparentemente perfeitas *in vitro* apresentam uma série de deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, o que possibilita uma rápida perda d'água, decorrente da quase inexistência de uma camada de cera protetora sobre a epiderme foliar. Além disso, a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é precária, não havendo fluxo transpiratório adequado (Farias, et al., 2012). A perda de plantas na fase de aclimatização pode ser muito alta, tornando-se um fator limitante no processo da micropropagação, em especial para plântulas de orquídeas que majoritariamente são germinadas *in vitro* (Galdiano Júnior et al., 2013). Essa passagem crítica, da fase *in vitro* para o vaso em casa de vegetação, deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade (Lone et al., 2008; Moraes et al., 2002).

Para *Epidendrum cinnabarinum*, não é conhecido qualquer registro na literatura abordando aspectos da sua reprodução *in vitro* e aclimatização. Pelo tamanho e colorido de suas flores, a espécie apresenta um destacado potencial para uso como planta ornamental ou para a obtenção de híbridos interespecíficos. Além disso, na Região Nordeste, apresenta uma distribuição disjunta, formando pequenas populações geneticamente isoladas em afloramentos rochosos de Brejo de Altitude e Caatinga (Pinheiro et al., 2014), o que torna a integridade gênica da espécie criticamente ameaçada. Desse modo, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o cultivo *in vitro* e *ex vitro* de *E. cinnabarinum*, utilizando diferentes concentrações de sacarose visando possíveis projetos conservacionistas ou para cultivo comercial da espécie.

Material e Métodos

Cultivo in vitro

O experimento foi desenvolvido no período de Dezembro de 2014 à Janeiro de 2016, na Universidade Federal da Paraíba no Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPB), no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais. Sementes de *E. cinnabarinum*, após terem sua cápsula descontaminada em álcool 70% por 3 minutos e em hipoclorito a 20% (v/v), foram inoculadas em tubos de ensaio em capela de fluxo laminar. O meio de cultivo foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido a metade dos sais, acrescido de 2g/L⁻¹ de carvão ativado, 7 g/L⁻¹ de ágar e em diferentes concentrações de sacarose, compondo os seguintes tratamentos, com 20 repetições: 0,0 (controle); 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0g.L⁻¹ de sacarose. O meio nutritivo foi esterilizado antes da inoculação, com pH estabilizado para 5,8.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de 25± 2°C. Aos 10 dias de inoculação foi avaliada presença de germinação e aos

80 dias avaliou-se a formação de primórdio foliar nos protocormos. Aos 270 dias de inoculação foram tomados ao acaso cinco repetições de cada tratamento, com exceção do controle, e foi contabilizada a quantidade de plântulas desenvolvidas em cada repetição, bem como os protocormos que ainda não tinham desenvolvido primórdios foliares. Dessas repetições foram retiradas 10 plântulas de cada, totalizando 200 plântulas, para avaliar o desenvolvimento com relação a: número de folhas, números de raízes, comprimento de maior raiz, comprimento da parte aérea, diâmetro de caule e massa fresca total.

Os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial utilizando o programa estatístico SAS 9.2 (2010). Os demais cultivos foram transferidos para meio MS, acrescido de 2g.L^{-1} de carvão ativado, 7g.L^{-1} de ágar e nas suas respectivas concentrações de sacarose.

Aclimatização

Após 60 dias de transferência para MS, plântulas com $3\text{cm} \pm 0,1\text{cm}$ de comprimento, foram transplantadas para recipientes coletivos, contendo um substrato formado por Vermiculita® + esfagno, na proporção de 1:1. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos formados pelas plantas oriundas de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose, com cinco repetições, com dez plantas por parcela, totalizando 200 plântulas. Todas as plântulas foram mantidas em sala de crescimento por uma semana, com os recipientes ainda vedados, feitos furos em suas tampas. Em seguida, foram transferidas para sala ambiente (sem luz artificial e sem? temperatura controlada) e, após uma semana, os recipientes tiveram suas tampas removidas. Com mais uma semana, os tratamentos foram transferidos para telado, com tela de 75% de sombra. As regas foram feitas em alternância de dias com borrifador contendo adubo foliar comercial 5-10-6 + micronutrientes (Aminomax).

Aos 45 dias de aclimatização as plântulas foram avaliadas quanto à taxa de sobrevivência, número de folhas, números de raízes, comprimento de maior raiz, comprimento da parte aérea, diâmetro de caule e comprimento de maior folha.

Os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial utilizando o programa estatístico SAS 9.2 (2010).

Resultados e Discussão

Germinação e desenvolvimento in vitro

Nos tratamentos na presença de sacarose houve germinação em todas as repetições, considerando como germinadas as sementes que formavam protocormos. Após 80 dias da inoculação, houve presença de primórdios foliares formados em todos os tratamentos, com exceção do controle. Todavia, na medida em que foi aumentada a concentração de sacarose, observou-se um aumento na formação de primórdios foliares (Figura 1).

O tratamento na ausência de sacarose apresentou 0% de germinação. As sementes de orquídeas não apresentam endosperma e cotilédone funcionais, sendo gotículas de lipídios as únicas substâncias de reserva contidas no embrião (Suzuki et al., 2009), o que pode justificar a não germinação na ausência de uma fonte de carbono. Em *Pterostylis sanguinea*, uma orquídea terrestre da subfamília Orchidoideae, o acréscimo de diferentes níveis, de 5 a 10 g.L⁻¹ de sacarose, promoveu o aumento na formação de tuberoses em relação ao controle (Debeljak et al., 2002).

Por outro lado, plantas com sementes providas de endosperma e outros tecidos de reserva, em geral germinam *in vitro* na ausência de sacarose, como por exemplo, *Byrsonima intermedia* (Nogueira et al., 2004), onde observou-se que o acréscimo de sacarose nos meios testados alterou as porcentagens de germinação, de forma que no cultivo de embriões e sementes a máxima porcentagem de germinação ocorreu em meio na ausência de sacarose, sendo 100% de germinação nos embriões e aproximadamente 60% nas sementes; *Genipa americana* L. (Almeida et al., 2013), onde observou-se mais de 90% de germinação na ausência de sais e sacarose.

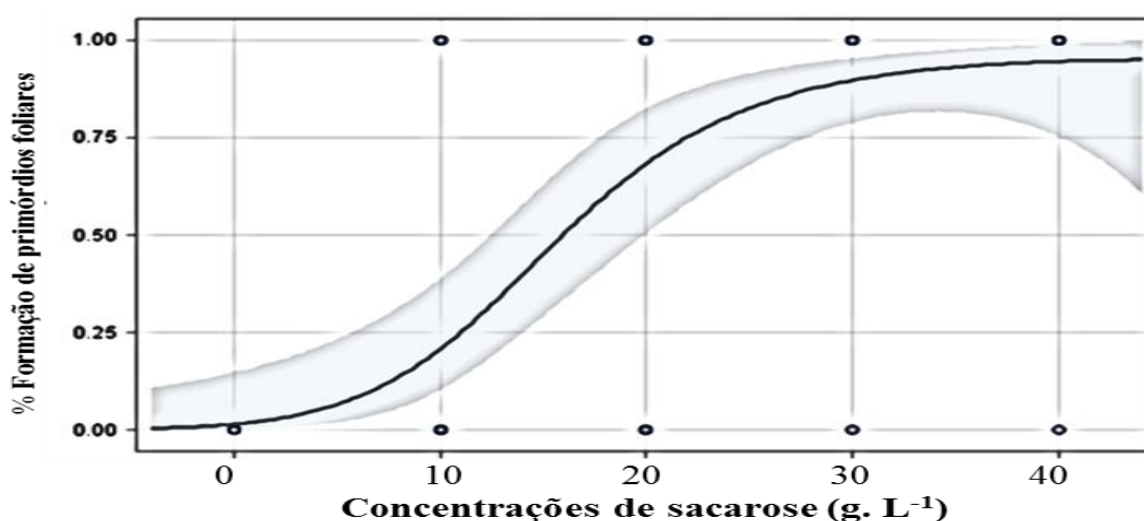


Figura 1: Formação de primórdios foliares em diferentes concentrações de sacarose aos 80 dias de inoculação das sementes de *E. cinnabarinum*.

Quanto ao comprimento da parte aérea da plântula o melhor resultado ocorreu para a concentração $20,0\text{g.L}^{-1}$ de sacarose, com uma média de 2,90 cm de comprimento, com redução a partir de $30,0\text{g.L}^{-1}$ (Figura 2A). Concentrações elevadas de sacarose, também influenciaram negativamente o crescimento de plântulas em *Caularthron bicornutum* (Hook) Rafinesque, que apresentou maior comprimento da parte aérea na concentração de $23,0\text{g.L}^{-1}$ (Pivetta et al., 2010). Por outro lado, *Dendrobium nobile* Lindley, apresentou os melhores resultados de crescimento para uma concentração de $60,0\text{g.L}^{-1}$ de sacarose, (Faria et al., 2004). Contudo, para a variável número de plântulas formadas o melhor resultado foi obtido na concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$ de sacarose (figura 2B).

Para número de raiz os melhores resultados foram observados nas concentrações $30,0\text{g.L}^{-1}$ e $40,0\text{g.L}^{-1}$, com média de uma raiz por plântula, enquanto nas concentrações de $10,0\text{g.L}^{-1}$ e $20,0\text{g.L}^{-1}$ a maioria das plântulas não apresentaram raízes (Figura 2C). Na Figura 3 é possível visualizar plântulas sem raiz em $10,0\text{g.L}^{-1}$ e $20,0\text{g.L}^{-1}$ e com raiz em concentrações maiores de sacarose. Uma concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$ de sacarose também promoveu melhor enraizamento em *Oncidium baueri* Lindley (Sorace et al., 2008). A obtenção de plantas *in vitro* com um sistema radicial bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento, principalmente quando da aclimatização e transplântio para a condição de vaso ou campo (Rocha et al., 2008). Para diâmetro de caule houve efeito estatístico, onde a concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$ de sacarose se destacou positivamente, com uma média de 0,11 cm (Figura 2D).

Para número de folha, comprimento da maior raiz e massa fresca total, embora a concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$ apresentou as maiores médias para ambas as variáveis, com médias de 1,1 cm e 2,25g para comprimento de maior raiz e massa fresca total, respectivamente. Esses resultados diferem dos encontrados por Galdiano Júnior (2013) onde concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$ proporcionou redução no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe.

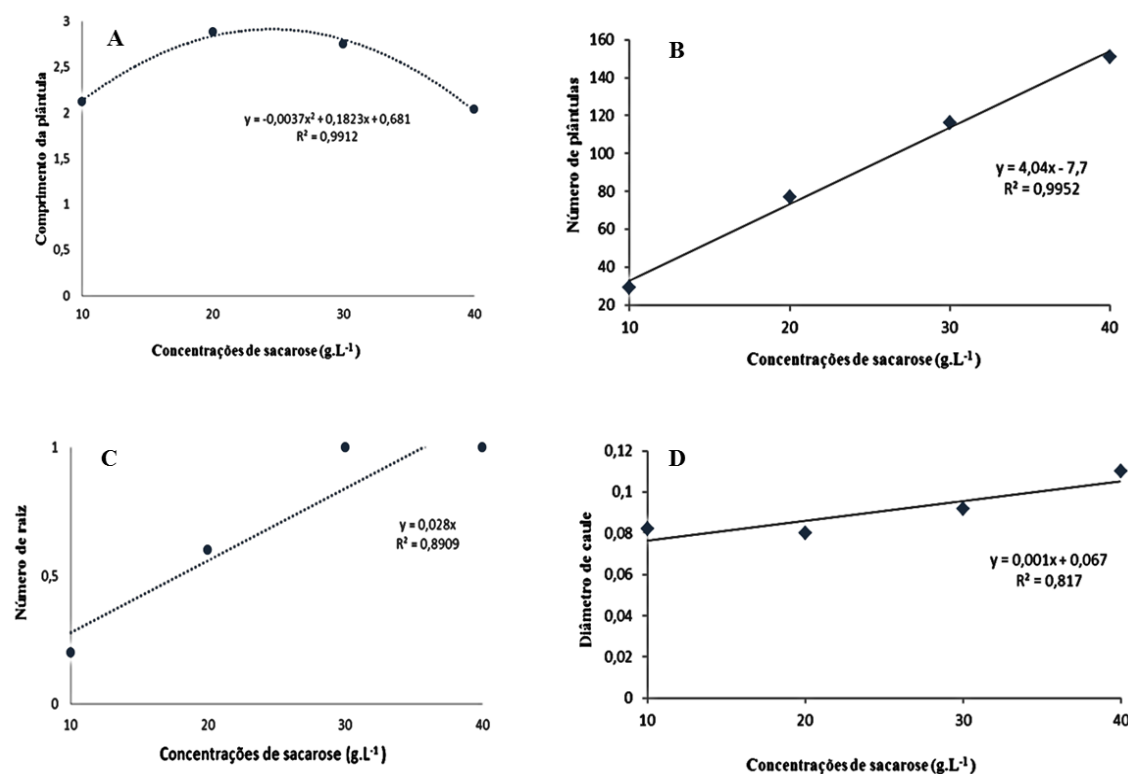


Figura 2: Médias de *E. cinnabarinum*, aos 270 dias após a inoculação, em diferentes concentrações de sacarose: A) Média de comprimento de parte aérea de plântula; B) Média de número de plântulas; C) Média de número de raiz; D) Média de diâmetro de caule.



Figura 3: Plântula de *E. cinnabarinum* aos 270 dias após inoculação, em diferentes concentrações de sacarose. A) 10,0g.L⁻¹ de sacarose; B) 20,0g.L⁻¹ de sacarose; C) 30,0g.L⁻¹ de sacarose e D) 40,0g.L⁻¹ de sacarose.

O presente trabalho mostra que uma concentração mais elevada de sacarose, neste caso $40,0\text{g.L}^{-1}$, proporcionou maior eficiência para a maioria das variáveis avaliadas. Rego-Oliveira et al (2003) em trabalho sobre a influência de carboidratos no cultivo *in vitro* de *Oncidium varicosum* observaram um melhor desenvolvimento *in vitro* numa concentração mais elevada de sacarose, $60,0\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, concentrações mais baixas de sacarose promoveram melhores resultados para o desenvolvimento *in vitro* para um híbrido entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana* (Fráguas et al., 2003) e para *Cattleya walkeriana* (Dignart et al., 2009).

Aclimatização

Após sete dias de aclimatização, 100% das plantas permaneceram vivas, enquanto aos 45 dias observou-se resultado diferente na taxa de sobrevivência, com menor percentual de plantas vivas nas concentrações de sacarose, $10,0\text{g.L}^{-1}$ e $20,0\text{g.L}^{-1}$, com aproximadamente 100% de sobrevivência das plantas nas concentrações mais elevadas de $30,0\text{g.L}^{-1}$ e $40,0\text{g.L}^{-1}$ (Figura 4A). O sucesso da aclimatização implica em alto grau de sobrevivência das plântulas e está, muitas vezes, na dependência da etapa de pré-acondicionamento *in vitro* (Calvete et al., 2002). O processo de aclimatização consiste na conversão da condição heterotrófica para a autotrófica, com paulatino retorno às características naturais da planta (Galdiano Júnior et al., 2013).

Para comprimento da planta o melhor resultado ocorreu na concentração de $30,0\text{g.L}^{-1}$ com plantas apresentando em média 4 cm de comprimento (Figura 4B), enquanto número de folhas, o melhor resultado foi na concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$, com uma média de 4 folhas (Figura 4C). O sucesso da aclimatização de plântulas cultivadas *in vitro* está relacionado à ocorrência de alterações anatômica tais como a formação de cera epicuticular e efetiva regulação estomatal. Essas alterações geralmente estão condicionadas a fatores do cultivo *in vitro* que promovam o enrijecimento das plântulas, o que pode ser obtido pelo decréscimo da concentração de sacarose (revisado por Pospíšilová et al., 2007).

Contudo, um efeito positivo para adição de sacarose na aclimatização de plântulas à condição *ex vitro*, também tem sido observado em diferentes grupos de plantas (e.g., Van Huylenbroeck and Debergh, 1996; Fila et al., 1998; Serret et al., 2001; Hoffman et al., 2002; Bandinelli et al., 2013) e também em Orchidaceae, como em *Anoectochilus formosanus* Hayata (Ket et al., 2004). Efeito positivo para adição de sacarose também foi observado para massa fresca (Figura 4D), assim como para diâmetro e comprimento da raiz (Figura 5E e 5F, respectivamente), especialmente para a concentração de $40,0\text{g.L}^{-1}$. Na Figura 5 é apresentada plantas de *E. cinnabarinum* aos 45 dias de aclimatizadas, podendo-se observar as raízes

desenvolvidas. Para as variáveis, números de raízes, diâmetro de caule e comprimento de maior folha, não houve efeito estatístico.

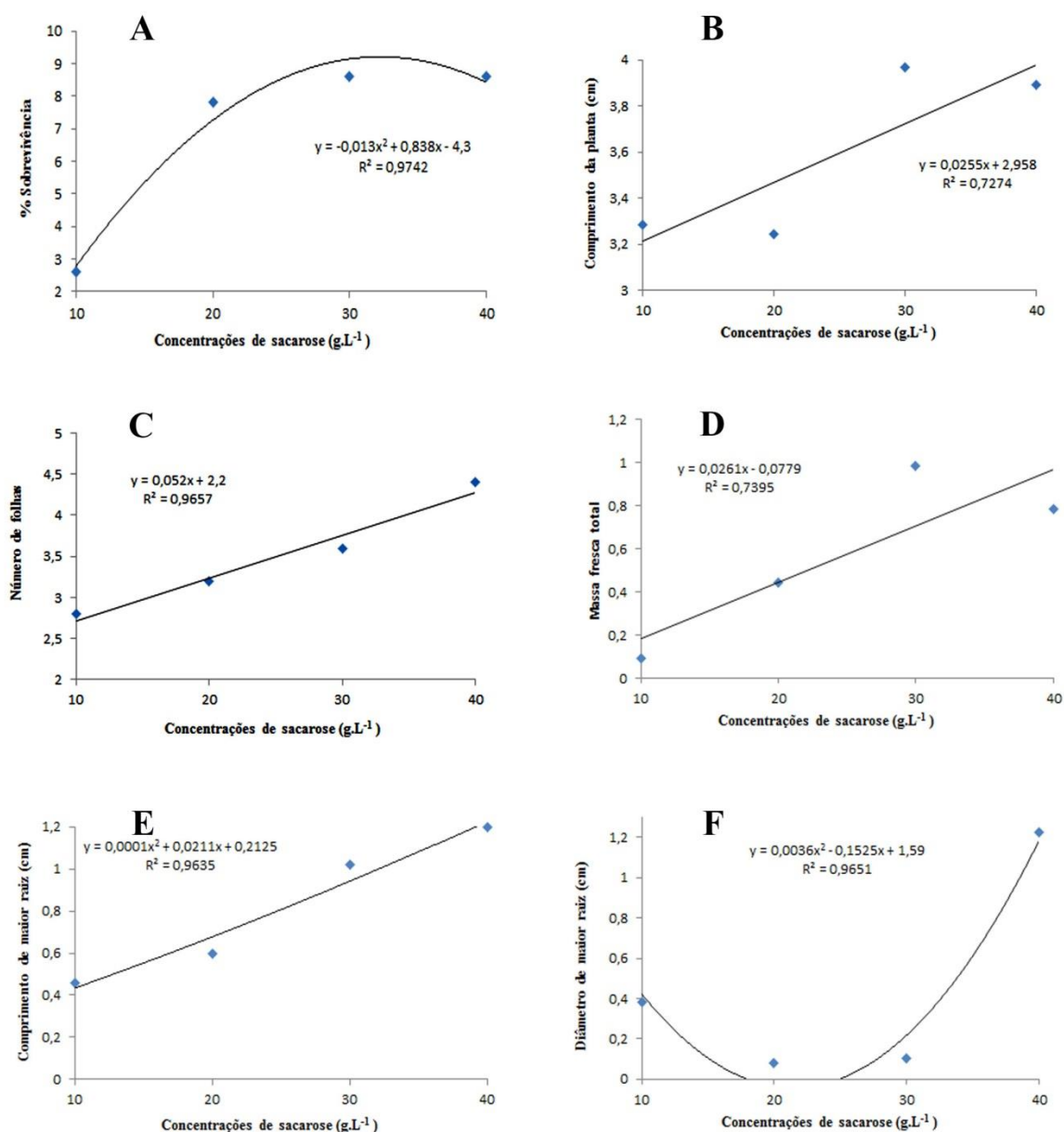


Figura 4. *E. cinnabarinum* aos 45 dias de aclimatadas, oriundas do cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose: A) Porcentagem de sobrevivência; B) Média de comprimento da plântula; C) Média de número de folhas; D) Média de massa fresca total; E) Média de comprimento de maior raiz de *E. cinnabarinum* e F) Média de diâmetro de maior raiz de *E. cinnabarinum* (aos 45 dias de aclimatadas, oriundas do cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose).

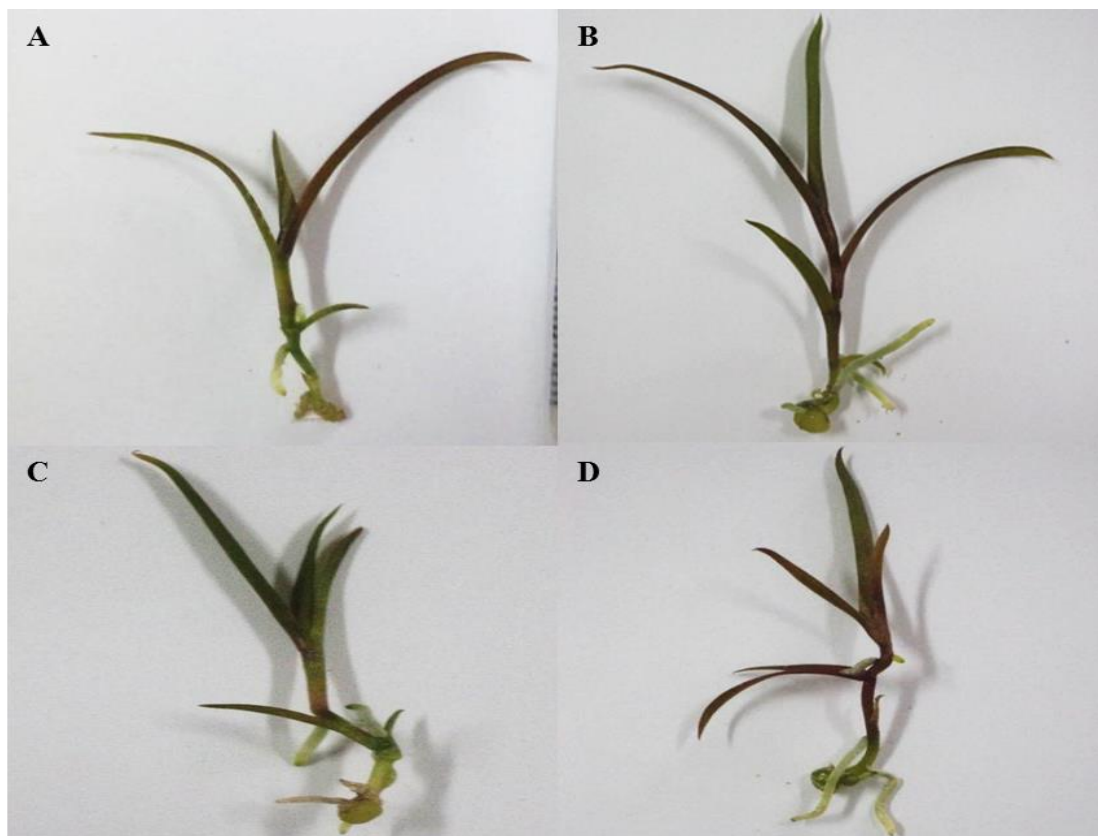


Figura 5. *E. cinnabarinum* aos 45 dias de aclimatadas, germinada e desenvolvida em diferentes concentrações de sacarose. A) 10,0g.L⁻¹ de sacarose; B) 20,0g.L⁻¹ de sacarose; C) 30,0g.L⁻¹ de sacarose e D) 40,0g.L⁻¹ de sacarose.

A nutrição autotrófica, induzida *in vitro*, nem sempre conduz a um melhor crescimento das plantas quando comparado com aquele obtido em um meio de cultivo contendo sacarose (Skrebsky et al., 2004). Com o presente trabalho foi possível demonstrar que a aclimatização de *E. cinnabarinum* foi favorecida pelo desenvolvimento *in vitro* em concentração acima de 30,0g.L⁻¹ de sacarose, especialmente a concentração de 40,0g.L⁻¹ que apresentou melhores resultados para a maioria das variáveis analisadas. Para *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra, por exemplo, a utilização de concentrações mais elevadas de sacarose, demonstrou que plantas cultivadas em concentrações acima 3% de sacarose tiveram um menor desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* (Freitas et al., 2015). Os resultados apresentados aqui revelaram melhor desenvolvimento para o cultivo *in vitro* e *ex vitro* de *E. cinnabarinum* obtidos na concentração de 40,0g.L⁻¹ de sacarose, sugerindo a necessidade de se testar concentrações mais elevadas até se obter uma concentração máxima ótima.

Considerações finais

O desenvolvimento *in viro* e *ex vitro* de *E. cinnabarinum* foi fortemente e positivamente influenciado pela concentração de sacarose no meio de cultura para todas as variáveis analisadas, com melhores resultados nas concentrações de 30,0g.L⁻¹ e 40,0g.L⁻¹ de sacarose. Contudo, como não foi observado um decréscimo no desenvolvimento das plântulas na concentração máxima utilizada em nosso experimento, o que não permite indicar se 40,0g.L⁻¹ é a concentração de sacarose ótima para o cultivo *in vitro* e para aclimatização desta espécie. Para isso, será necessário conduzir novos experimentos envolvendo maiores concentrações de sacarose, a fim de identificar a concentração ótima para a espécie. Contudo, especialmente pelo rápido desenvolvimento observado na aclimatização da espécie, uma concentração de sacarose de 40,0g.L⁻¹ poderá ser utilizada para o cultivo *in vitro* e *ex vitro* desta espécie, tanto para fins comerciais, como de conservação.

Rerefências

ALMEIDA, C. S.; LÉDO, A. S.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F.; J. E. SANTOS; RIBEIRO, VILANOVA NETA, M. M. J.; J. L. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* do jenipapeiro. **Scientia Plena**. 9, 100203, 2013.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: J. Wiley, 1992. 691 p.

BANDINELLI, M. G.; BISOGNIN, D. A.; GNOCATO, F. S.; MAMBRIN, R. B; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F. T. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, v.31, p.242-247, 2013.

BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11529>. Acesso em: 25 Jan. 2016

BARTHLOTT, W. & POREMBSKI, S. 2000. Vascular plants on inselbergs: systematic overview. In S. POREMBSKI & W. BARTHLOTT, (Eds). Inselbergs –biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. **Ecological Studies**. Springer-Verlag, Berlin, v.146, p.103-116.

BATTY, A.L.; DIXON, K.W.; BRUNDRETT, M. & SIVASITHAMPARAM, K. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. **Australian Journal of Botany**, 49:619-628, 2001.

CAIAFA, A. N.; SILVA, A. F. Strutural analysis of the vegetation on a highland granitic rock outcrop in Southeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 657-664, out. 2007.

CALVETE, E.O.; KÄMPF ,A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 186-191, junho 2002.

CHANG, W-C. In vitro Morphogenesis and Micro-Propagation of Orchids. In: CHEN, W. H.; CHEN, H. H. (Eds.). Orchid biotechnology. Londres: **World Scientific**, 2007. P. 45-64.

CHASE, M.W., CAMERON, K.N., FREUDENSTEIN, J.V., PRIDGEON, A.M., SALAZAR, G., VAN DENBERG, C. & SCHUITMAN, A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 177: 151-174.

DEBELJAK, N.; REGVAR, M.; K.W. DIXON, & SIVASITHAMPARAM, K. 2002. Induction of tuberisation in vitro with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*. **Plant Growth Regulation** 36: 253–260.

DEBERGH, P. A cultura *in vitro* de plantas ornamentais. In: VASIL, I.K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Células de plantas e a cultura de tecidos**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 561-573.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. DE; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo in vitro de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun., 2009.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.780-783, out-dez 2004.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. 2008. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. **Physiologia Plantarum**, 102: 411-418.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V. de; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento in vitro de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Ceres**, v.50, p.719-726, 2003.

FREITAS, CAMILA.; CARVALHO, V.; NIEVOLA, C. C. Effect of sucrose concentrations on in vitro growth and subsequent acclimatization of the native bromeliad *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra. **Revista Biotemas**, v.28, p. 37-42, 2015.

FREUDENSTEIN. JOHN. V.; RASMUSSEN. F. N. What does morphology tell us about orchid relationships?—a cladistic analysis. **American Journal of Botany**. vol.83, p. 225–248. 1999.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. Ge. de M. Desenvolvimento inicial e crescimento in vitro de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**. vol. 43, p. 127-134. 2013.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T. DE; LEMOS, E. G. DE M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento in vitro e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 34, p. 583-592, mar./abr. 2013.

GRANT, V. 1989. *Especiación vegetal*. Noriega Editores, México.

HÁGSATER E, SOTO ARENAS MA. 2005. *Epidendrum* L. In: PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW, RASMUSSEN FN, (Eds). **Genera Orchidacearum**, vol 4. Oxford University Press, Oxford, pp 236-251.

HOFFMAN, P., HASEL, D., KOMENDA, J., VÁGNER, M., TICHÁ, I., SCHÄFER, C. AND ČAPKOVÁ, V. 2002. Impact of in vitro cultivation conditions on stress responses and on changes in thylakoid membrane proteins and pigments of tobacco during ex vitro acclimatization. **Biologia Plantarum**. 45:189–195.

KERBAUY, G. B.; L. (2011). Micropropagação Comercial de Orquídeas: Conquistas, Desafios e Perspectivas. In: GERALD, L. T. S (coord) p. 178-205. Biofábrica de plantas: Produção Industrial de Plantas in vitro. São Paulo: **Antiqua**.

KET, N.V; HAHN, E.J; PARK, S.Y, CHAKRABARTY, D & PAEK K.Y (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. **Biologia Plantarum**, vol. 48, p. 338-344.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. DE. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 30, p. 465-469, 2008.

MORAES, L. M. DE; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum.** Maringá, v. 24, p. 1397-1400, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid grow and biossays with tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H. DE.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia.** Lavras, v. 28, p. 1053-1059, set.out., 2004.

OLIVEIRA, I. V. G. DE.; RAUPP, G.; RAUPP, R. O.; BOEMEKER JÚNIOR, L. C. **Orquídeas: reprodução assimbiótica.** Pelotas: Editora Universitária/UFPEL, 2010, 152p.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; DRAPER, D.; BARROS, F.; FELIX, L.P.; FAY, M.F.; PALMA-SILVA, C. 2014. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology.** vol.14, p. 49.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. DE; TAKANE, R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1897-1902, set, 2010.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HASEL, D.; SEMORÁDOVÁ, Š. Acclimation of Plantlets to *Ex Vitro* Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO₂ Concentration and Absciscic Acid (a Review). **Acta Horticulturae.** 748,p. 29-38. 2007.

REGO-OLIVEIRA, L. DO V.; FARIA, R.T. DE; FONSECA, I. C. DE B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 265-272. 2003.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? **IX Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica.** Brasília. 2011.

ROCHA, M. A. C. DA; COSTA, M. A. P. DE C.; ALVES, S. S.; LEDO, C. A. DA S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 30, p. 769-774, 2008.

SERRET, M.D., TRILLAS, M.I. AND ARAUS, J.L. The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of photoinhibition during acclimation of gardenia plantlets to *ex vitro* conditions. **Photosynthetica**. vol. 39, p. 67–73. 2001.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. TE.; FERRÃO, G. DA E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1471-1477, set-out, 2004.

SORACE, M.; FARIA, R. T. DE.; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L. DA.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, p. 775-782, out./dez. 2008.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. DE M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**. vol.36, p. 657-666, 2009.

THAN, M. M. M.; MAJUMDER, A.; PAL, A. & JHA, SUMITA. Genomic variations among *in vitro* regenerated *Bulbophyllum auricomum* Lindl. Plants. **Nucleus** (April 2011) 54(1):9–17.

ULISSES, Cláudia; SOARES, Guilherme. **Aclimatização de mudas de orquídeas na agricultura familiar**: Biotecnologia, gestão e Inovação na floricultura em Pernambuco. Recife, Editora: FASA. 106 p. 2013.

VAN HUYLENBROECK, J.M. AND DEBERGH, P.C. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiologia Plantarum**. vol. 96, p. 298–304.

Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB – Qualis B2 - Biodiversidade

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO .

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Referências

- A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

